

Patricia Simone Burkert
Dr. med

Veränderung der N-methyl-D-asparat-Rezeptoruntereinheit 2A für ein Tiermodell

Geboren am 23.05.1979 in Stuttgart, Staatsexamen am 24.05.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Klinische Neurologie
Doktormutter: Prof. Dr. Hannah Monyer

Die Arbeit NR2A/B befaßt sich mit der Rezeptoruntereinheit NR2A des NMDA-Rezeptors. Ziel des Projekts ist es, weiterreichende Information über die Funktion des NMDA-Rezeptors zu gewinnen. Insbesondere die Unterschiede der verschiedenen intrazellulären Teile der NMDA-Rezeptoruntereinheiten stehen im Mittelpunkt des Interesses.

Es wurde in einem Expressionsvektor ein verändertes cDNA-Testkonstrukt sowie ein Targeting-Konstrukt erstellt, welches für die Herstellung einer chimären Maus Verwendung finden wird. Ziel der Arbeit war, im cDNA-Konstrukt den C-terminalen Anteil durch denjenigen der Rezeptoruntereinheit NR2B zu ersetzen und anschließend für die Integration in embryonalen Stammzellen flankierende genomische DNA anzufügen.

In mehreren Schritten wurde das cDNA-Testkonstrukt zusammengefügt. Nach dem Austausch des C-terminalen Anteils wurde N-terminal die GFP-Sequenz eingefügt. Zur Identifizierung integrierter DNA in den Stammzellen wurde hinter den C-terminalen Teil zwischen zwei loxP-Stellen eine Neomycinresistenzkassette eingesetzt. Außerdem wurde N-terminal eine Signalsequenz und C-terminal eine Polyadenylierungssequenz angesetzt. Dies soll die korrekte Expression des veränderten Proteins gewährleisten. Nachdem das cDNA-Testkonstrukt in HEK 293-Zellen getestet worden war (Georg Köhr, MPI f. med. Forschung, Heidelberg), wurden die flankierenden genomischen Sequenzen eingefügt.

Für die homologe Rekombination wurden Enzyme getestet, die für einen Southern-Blot verwendet werden können, der die Unterscheidung zwischen Wildtypallel und Targetingallel ermöglicht. Dazu wurden sowohl für die korrekte Integration am 3'-Ende als auch am 5'-Ende Enzyme getestet, die sowohl außerhalb des Targetingkonstruktes und der entsprechenden Teile des Wildtypallels, als auch innerhalb dessen Schnittstellen aufweisen. Die charakteristischen Fragmente werden mit einer Sonde markiert, welche ebenfalls der Sequenz außerhalb des Konstruktes entspricht. Verschiedene Sonden wurden getestet.

Das Ergebnis meiner Arbeit ist das fertiggestellte Targetingkonstrukt, welches im weiteren erfolgreich in ES-Zellen integriert wurde.

Ziel des gesamten Projekts ist das gezüchtete Mausmodell NR2A/B. Dieses Modell wird in Zukunft Verwendung finden können zu Experimenten, die sich mit dem NMDA-Rezeptorkomplex beschäftigen. Besondere Bedeutung haben dabei Experimente zur Rezeptorzusammensetzung während der Entwicklung und bei adulten Mäusen, zu Neuronalem Lernen, zur Signaltransduktion, zum Rezeptortargeting sowie zu Zelltodmechanismen.